

Patent Number:

JP5192200

Publication date:

1993-08-03

Inventor(s):

OKAZAWA KAZUhide; others: 04

Applicant(s):

TAKARA SHUZO CO LTD

Requested Patent:

JP5192200

Application Number:

JP19910230839 19910819

Priority Number(s):

IPC Classification:

C12Q1/70; C12Q1/68

EC Classification:

Equivalents:

JP2785164B2

Abstract

PURPOSE: To determine the DNA region of human papilloma virus (HPV) common to benign type and/or malignant type and to provide a method for detecting the sequence and a kit therefor.

CONSTITUTION: A benign type and/or malignant type HPV can be detected by detecting the DNA sequence of the E6 and/or E7 region of HPV. The HPV detection kit contains a specific primer for amplifying the HPV region and a probe for detecting the amplified

DNA. The kit enables easy typing of each HPV.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-192200

(43) 公開日 平成5年(1993)8月3日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/70	Z N A	8114-4B		
1/68	Z N A A	8114-4B		

審査請求 未請求 請求項の数2(全18頁)

(21) 出願番号 特願平3-230839

(22) 出願日 平成3年(1991)8月19日

(31) 優先権主張番号 特願平2-217067

(32) 優先日 平2(1990)8月20日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 591038141

實酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72) 発明者 岡澤 一秀

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造
株式会社中央研究所内

(72) 発明者 高田 雅光

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造
株式会社中央研究所内

(72) 発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造
株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトパピローマウイルスの検出方法

(57) 【要約】

【目的】 良性型及び／又は悪性型に共通なヒトパピローマウイルス (HPV) のDNA領域を決定し、その配列の検出方法及びキットを提供する。

【構成】 HPVのE6及び／又はE7領域のDNA配列を検出することによる良性型及び／又は悪性型HPVの検出方法。HPVの前記領域を増幅させるための特定のプライマーと、増幅されたDNAを検出するためのプローブを含有するHPV検出キット。

【効果】 各HPVのタイピングを簡便に行うことができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 良性型及び／又は悪性型ヒトパピローマウイルスの検出方法において、該ヒトパピローマウイルスのE6及び／又はE7領域のDNA配列を検出することを特徴とするヒトパピローマウイルスの検出方法。

【請求項2】 請求項1記載の方法を用いて検出を行うための検出キットであって、ヒトパピローマウイルスのE6及び／又はE7領域を増幅させるための特定のプライマー、及び増幅されたDNAを検出するためのプローブを含有していることを特徴とするヒトパピローマウイルスの検出キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒトパピローマウイルス（以下HPVと略記する）の検出方法に関し、更に詳細には良性型及び／又は悪性型HPVの特異的な検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 HPVは、パポウイルス(papova virus)科に属する小型DNAウイルスで、ヒトの皮膚のいぼ、口腔、肛門、性器の尖圭コンジローマなどから分離され、昔からいぼをつくるウイルスとして知られてきた。HPVは、現在60種以上もの異なったタイプが見ついている。このうちHPV6、HPV11は尖圭コンジローマ等、主に性器に良性の腫瘍を引起す良性型HPVである。またがんに至る悪性腫瘍を引起す代表的HPVとして、以前よりHPV16、HPV18が知られていたが、現在HPV31、HPV33等の悪性型HPVの存在が知られている〔デビラス(de Villiers)、ジャーナル オブ ビロロジー(Journal of Virology)、第63巻、第4898～4903頁(1989)〕。HPVが子宮頸がんを引起す要因の一つである〔M. デュルスト(M. Duerst)ほか、プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第80巻、第3812～3815頁(1983)〕という報告がなされて以来、子宮頸部組織からHPVを検出する様々な試みが行われてきた。残念ながら、HPVはいまだウイルス粒子での存在が認められず、試験管内増殖系を持たないため、その検出は抗体による方法とウイルスDNAを検出する方法が取られている。HPV DNAを検出する代表的な方法として、従来よりサザンハイブリダイゼーション法がとられている。実際、M. デュルストらはこの方法で、子宮頸がん組織より約60%の試料にHPV16型あるいは18型DNAを検出している。更に簡便で高感度な検出方法として、PCR(Polymerase Chain Reaction)法がある〔メソッズ イン エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、第155巻、第335～350頁(1987)〕。PCR法は、増幅したいDNA領域の両端に一

2

対のオリゴヌクレオチドプライマーを設定し、耐熱性タックポリメラーゼを用いて、目的DNAを指数的に増幅させる方法である。DNAの変性→プライマーDNAのアニール→DNA相補鎖の酵素的合成といった温度サイクルを25回繰返せば、目的DNAは約10万倍に増幅される。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 前述のHPV検出方法のうち、HPV抗体を用いる方法は操作が煩雑で、また感度の点で問題がある。一方、ヒト性器や子宮頸部組織よりHPV DNAを検出する際、従来のサザンハイブリダイゼーション法やPCR法では、一種類のHPVに限定してプローブやプライマー対を設定するため、特定の型しか検出できない。このため、複数種のHPVを検出するにはその都度プローブやプライマー対を設定し別々の反応系で行わねばならず、操作が煩雑になる。性器腫瘍に数多くのHPVが関与することが認められている現状において、一回の反応系でできるだけ多種のHPVを検出することが求められている。すなわち、本発明の目的は、良性型及び／又は悪性型に共通なHPVのDNA領域を決定し、その配列の検出方法及びキットを提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明を概説すれば、本発明の第1の発明はHPVの検出方法に関し、良性型及び／又は悪性型HPVの検出方法において、良性型及び／又は悪性型HPVのE6及び／又はE7領域のDNA配列を検出することを特徴とする。また、本発明の第2の発明は第1の発明の方法を用いて検出を行うための検出キットに関し、ヒトパピローマウイルスのE6及び／又はE7領域を増幅させるための特定のプライマー及び増幅されたDNAを検出するためのプローブを含有していることを特徴とする。

【0005】 子宮頸がん組織中のHPV DNAは、エピソーム状態のほかヒトゲノム中に挿入された形で存在することが明らかとなっており、しかも粗込まれたHPV DNAは、通常多くの欠損がみられ、完全に保存されているのは初期遺伝子E6及びE7の領域のみである例が多く見出されている〔E. シュワルツ(E. Schwarz)ほか、ネイチャー(Nature)、第314巻、第111～114頁(1985)〕。本発明において、良性型及び／又は悪性型のHPVのDNAの検出に用いる領域は、E6及び／又はE7領域より、そのホモロジーの高い配列を含む領域(高ホモロジー領域)を選択する。良性型のHPVとしては、例えばHPV6、HPV11等が、悪性型のHPVとしては、例えばHPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HP52b及びHPV58等があり、その一部については以下の様にDNA塩基配列が知られている〔HPV6; E. シュワルツほか、ジエンボ ジャーナル(the EMBO J.) 第2巻、第2341頁

(1983)、HPV11; K. ダートマン(K. Dartmann) ほか、ピロロジー(Virology)、第151巻、第124頁 (1986)、HPV16; K. シードルフ(K. Seedorf) ほか、ピロロジー、第145巻、第181頁 (1985)、HPV31; S. T. コール(S.T. Cole) ほか、ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー(J. Mol. Biol.)、第193巻、第599頁 (1987)、HPV31; M. D. ゴールズボロー(M.D. Goldsborough) ほか、ピロロジー、第171巻、第306頁 (1989)、HPV33; S. T. コールほか、ジャーナル オブ ピロロジー、第58巻、第991頁 (1986))。

【0006】HPV6とHPV11等のE6・E7領域中の高ホモロジー領域、あるいはHPV16とHPV18、HPV31、HPV33等のE6・E7領域中の高ホモロジー領域は、例えばDNAシーケンス入力解析シ*

*ステムDNASIS (宝酒造社) を用いて検索することができる。

【0007】それぞれのHPVの種類について、これらの高ホモロジー領域として利用できる塩基配列の例を配列表の配列番号1～23に示す。すなわち、配列表の配列番号1～4はHPV6、配列番号5～8はHPV11、配列番号9～12はHPV16、配列番号13～15はHPV18、配列番号16～19はHPV31、配列番号20～23はHPV33についてそれぞれ高ホモロジー領域として利用できる塩基配列の例を示すものである。また、これらの塩基配列を、ホモロジーの高い部分ごとにまとめた例を表1及び表2に示す。なお配列表の各配列及び表1及び表2において示した塩基番号は前述の引用文献に記載されたものと一致する。

【0008】

【表1】

表1 各HPVについての高ホモロジー領域

領域	HPVの種類	塩基番号	参照 (配列番号)
I	6	26-46	1
	11	26-46	5
	16	26-46	9
	18	33-53	13
	31	29-49	16
	33	30-50	20
II	6	608-627	4
	11	608-627	8
	16	637-656	12
	18	674-693	15
	31	635-654	19
	33	648-667	23

【0009】

【表2】

表2 各HPVについての高ホモロジー領域

領域	HPVの種類	塩基番号	参照(配列番号)
III	16	419-438	10
	18	426-445	14
	31	423-442	17
	33	424-443	21
IV	16	598-626	11
	31	596-624	18
	33	609-637	22
V	6	400-419	2
	11	400-419	6
VI	6	512-531	3
	11	512-531	7

【0010】これらのDNA領域を検出する方法としては、例えば、PCR法を簡便で高感度な方法として用いることができる。すなわち、良性型及び／又は悪性型HPVの高ホモロジー領域について共通プライマーを選定し、これを用いてDNA配列を増幅し、検出すれば良い。各共通プライマーは、例えばDNA合成機で合成し、HPLCで精製して、用いることができる。このようなプライマーの例を配列表の配列番号24～28に示す。

【0011】すなわち、上記プライマーのうち、配列表の配列番号24、25でそれぞれ表されるpU-O、p16-1は表1及び表2に示した高ホモロジー領域のIの塩基配列に、配列表の配列番号26で表されるpU-31Bは領域Vの塩基配列に、配列表の配列番号27で表されるpU-1Mは領域IIIの塩基配列に、配列表の配列番号28で表されるpU-2Rは領域IIの塩基配列の相補的配列にそれぞれ相同性が高い配列を有しており、これらのプライマーは共通プライマーとして有効である。配列表の配列番号24～28に示した5種のプライマーのうち、例えばpU-O又はp16-1とpU-2Rの対を用いればHPV6、HPV11、HPV16、HPV18、HPV31、HPV33のDNA配列を、pU-31BとpU-2Rの対を用いれば良性型HPVであるHPV6、HPV11のDNA配列を、pU-1MとpU-2Rの対を用いれば悪性型HPVであるHPV16、HPV18、HPV31、HPV33のDNA配列を特異的に増幅させることができる。

【0012】検出する試料としては、例えばHPVをクローニングしたプラスミド、尖圭コンジローマ、子宮頸がん及び前がん病変等の病理試料等を用いることができる。また、細胞、組織からのDNAの調製は、公知の確

立された方法を用いればよい。

【0013】PCR法については、タックポリメラーゼを含む遺伝子増幅キット及び自動遺伝子増幅装置が、宝酒造社から市販されており、上記のプライマー対を用い、特定のDNA領域の増幅反応を行えば良い。増幅後のHPV DNAは、例えばアガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色にて検出することができる。アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色で増幅領域を確認できないときは、例えばドットハイブリダイゼーション法を用いて検出することができる。

【0014】プライマー対で増幅したサンプルをドットハイブリダイゼーションするとき、例えば増幅領域内でプライマー部位とは別の高いホモロジーを有する部位を元にデザインした各型共通のオリゴヌクレオチドプローブ(ユニバーサルプローブ)等を用いると便利である。このプローブはハイブリダイゼーションにおける特異性を高めるため、ミスマッチの起こりうる箇所に塩基を重複させたミックスプローブ、あるいはその様な箇所をイノシンに置き換えたプローブにすればよい。その様な配列の例を配列表の配列番号29～31に示す。

【0015】上記のプローブのうち、配列表の配列番号29で表されるpBU-1は、表2に示した高ホモロジー領域のIVの塩基配列部分、配列表の配列番号31で表されるpBU-3はIVの塩基配列部分を認識する共通プローブである。また、配列表の配列番号30で表されるpBU-2はHPV18の特異的塩基配列であり、前出の文献記載の塩基番号の635～663の部分に相当する。例えば、悪性型の4種のHPVを同時に検出したい場合には、pBU-1とpBU-2を混合して使用すればよい。

【0016】増幅された各HPV由来のDNAについ

て、型の同定を行うには、例えば各型に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いればよい。悪性HPVの各型に特異的なオリゴヌクレオチドプローブの例を配列表の配列番号32～35に示す。配列表の配列番号32で表されるpSB-16はHPV16に、配列表の配列番号33で表されるpSB-18はHPV18に、配列表の配列番号34で表されるpSB-31はHPV31に、配列表の配列番号35で表されるpSB-33はHPV33に、それぞれ特異的なプローブである。

【0017】また、配列表の配列番号24～28に示したプライマー対を用いて、各HPVDNAをPCR法で増幅させたフラグメントを各HPVに特異的なプローブとして用いることもできる。

【0018】これらのプローブDNAは、前記プライマーDNAと同様の方法で合成・精製することができる。該プローブDNAは標識化することにより、高感度な検出が可能となる。標識化の方法としては、公知の方法ならなんでもよいが、例えばT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いプローブDNAの5'末端を³²Pで標識化するアイソトープ標識方法でも良いし、プローブDNAの酵素標識、ビオチン-アビジン系での標識、またケミプローブのようにプローブDNAにスルホン基を導入し、それを抗体を用いて認識するような方法での標識方法等の、非アイソトープ標識方法でも良い。

【0019】更に、これらのプローブDNAを用いて、従来行われているハイブリダイゼーション法によるHPVDNA配列の検出を行うこともできる。この場合、配列表の配列番号24～28に示した各共通プライマーもプローブとして用いることができる。すなわち、pU-O、p16-1若しくはpU-2Rを用いればHPV6、HPV11、HPV16、HPV18、HPV31、HPV33を、pU-31Bを用いればHPV6、HPV11を、pU-1Mを用いればHPV16、HPV18、HPV31、HPV33を検出することができる。本発明の方法により検出することができるHPVのうち、悪性型HPVとしては、前述のHPV16、HPV18、HPV31、HPV33のほかに、例えばイト

表 3

ウラ、又はマツクラらにより報告され、そのHPVDNAがクローニングされている、HPV52b、HPV58等があり〔キャンサー リサーチ(Cancer Res.)、第48巻、第7164頁(1988)、1990年5月30日、日本癌学会発行、第49回 日本癌学会総会記事第123頁、講演番号第370番〕、これらのHPVDNAも、本発明の方法により効率よく増幅され、検出される。

【0020】また、通常の方法でPCRを行った(1次PCR)後、更に内側のプライマー対により再びPCRを行い(2次PCR)、感度よく目的DNAを検出する方法すなわち二重PCR法を用いて、HPVDNAの検出の感度をより高めることができる。すなわち、例えばプライマーpU-O又はp16-1と、プライマーpU-2Rを用いて1次PCRを行い、良性型及び悪性型HPVのDNAを増幅し、更に、プライマーpU-31B及びpU-2Rを用いた2次PCRで良性型のHPVDNAを、プライマーpU-1M及びpU-2Rを用いた2次PCRで良性型のHPVDNAを、より効率よく増幅し、感度よくHPVDNAを検出することができる。

【0021】更に、PCRで増幅された各HPVDNAを特定の制限酵素で処理した後、その切断パターンを、例えば、アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色により解析することにより、各HPVのタイピングを行うことができる。例えば、p16-1とpU-2Rの1次PCR後にpU-1M及びpU-2Rにより増幅されたHPV16DNAは、制限酵素AvaIIにより切断され、電気泳動によって157bp及び81bpのDNA断片が特異的に検出されて、増幅されたHPVDNAがHPV16であることが確認できる。pU-1M及びpU-2R又はpU-31B及びpU-2Rにより増幅された各HPVDNAと制限酵素の組合せの例及び検出されたDNA断片の例を表3に示す(表中-は制限酵素が作用しないことを示す)。

【0022】

【表3】

HPV	増幅鎖長 (bp)	制限酵素、		切断パターン(bd)	
		Ava II	Rsa I	Bgl II	Acc I
HPV 6	230	-	134、96	-	-
HPV11	230	-	166、64	-	-
HPV16	238	157、81	-	-	-
HPV18	268	172、96	-	-	-
HPV31	232	-	118、114	-	-
HPV33	244	136、108	-	-	-
HPV52b	231	-	-	176、55	-
HPV58	244	-	-	-	126、118

【0023】PCRで増幅され、増幅DNAの制限酵素による切断パターンにより同定されなかったHPVは、例えば、その未同定HPVが検出された試料より、ヒトゲノムDNAを調製し、好適なベクターを用いライブラリーを作成し、クローニングし、目的のDNAの塩基配列を決定する。その結果、この未同定のHPVは、新しいタイプのウイルスと同定され、本発明者らは、この新種をHPV-Sapporoと命名した。配列表の配列番号36にHPV-Sapporoの塩基配列及びその対応するアミノ酸配列を示す。この塩基配列又は一部の配列、これらの塩基配列にハイブリダイズ可能な塩基配列はHPV-Sapporoを検出するための有用な新規配列である。またHPV-Sapporo遺伝子がコードするタンパク質、その一部のポリペプチド等も種々の分野において有用である。

【0024】配列表の配列番号37にHPV-Sapporoを本発明の共通プライマー対、pU-1MとpU-2Rで増幅させたDNAを検出するためのプローブの例、すなわちpSB-Sの塩基配列、配列表の配列番号38、39にHPV-Sapporoに特異的なPCR用の一対のプライマーの例、pS-1及びpS-2Rの塩基配列、配列表の配列番号40に、該プライマー対で増幅されたDNA検出用のプローブの例、pBS-1の塩基配列をそれぞれ示す。なお、これらのプライマーは、HPV-Sapporoを特異的に増幅できるものであれば良く、プローブとしては、増幅されたDNAを特異的に検出できるものであれば良い。

【0025】また本発明の良性型及び/又は悪性型HPVのDNAを増幅させるためのプライマー対をそろえてキットとしておくことで、各型のHPVDNAを効率よく検出することができる。また、キット中にはユニバーサルプローブ、各HPV型特異的のプローブ、制限酵素等を含有させておいても良い。なお、キットに用いる試薬は溶液状でも良いし、凍結乾燥物でも良い。

【0026】以上詳細に述べた様に、本発明の方法によれば試料中に存在する複数種のHPV DNAを一回の反応で検出することができ、また、特定の制限酵素の切断パターンや、型特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いて、各HPV型の簡便なタイピングが可能となる。更に、本発明のキットは新種のHPVのスクリーニングにおいても有力な手段となる。

【0027】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

【0028】実施例1. 共通プライマーを用いた、PCR法によるHPV DNA特定領域の増幅

【0029】(1-1) オリゴヌクレオチドプライマーDNA及びプローブDNAの合成及び精製

PCR法により特定のDNA配列を増幅させるには、そ

の領域の5'末端より約20塩基のセンス配列及び3'末端より約20塩基のアンチセンス配列のオリゴヌクレオチドプライマーDNAが必要である。またドットハイブリダイゼーション法により感度良くHPV DNAを検出する共通のオリゴヌクレオチドプローブDNAや、タイピング用の型特異的オリゴヌクレオチドプローブDNAが必要である。配列表の配列番号24~35でそれぞれ表されるプライマーDNA及びプローブDNAをアブリダイオシステムズ社のDNA合成機を用いて合成し、脱保護の後、イオン交換HPLC(TSKゲル、DEAE-2SWカラム)で精製し、セパパック(Sepapak)C18(ウォーターズ社)で脱塩し、各DNA約50 μ gを得た。

【0030】(1-2) pU-1M及びpU-2Rを用いたHPV DNA特定領域のPCR法による増幅
それぞれHPV6、HPV11、HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV52b、HPV58DNAの全長が挿入されているプラスミド8種類入手した。なお、例えばHPV6 DNA全長が挿入されたプラスミドは、pHPV6というように命名した〔pHPV6; ジャーナル オブ ビロロジー、第40巻、第932頁(1981)、pHPV11; ジャーナル オブ ビロロジー、第44巻、第393頁(1982)、pHPV16; プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ USA、第80巻、第3812頁(1984)、pHPV18; ジ エンボ ジャーナル、第3巻、第1151頁(1984)、pHPV31; ジャーナル オブ ビロロジー、第58巻、第225頁(1986)、pHPV33; ネーチャー、第321巻、第246頁(1986)、pHPV52b; キャンサー リサーチ(Cancer Res.)、第48巻、第7164頁(1988)、pHPV58; 1990年5月30日、日本癌学会発行、第49回 日本癌学会総会記事第123頁、講演番号第370番、及び同年7月3日に行われた同総会での講演参照〕。これらプラスミドDNA1 μ gを、0.5ml用チューブ(パイオビック社)に取り、94 $^{\circ}$ C、10分加熱処理した後、ジーン アンブ キット(Gene AmpTM Kit)(宝酒造社)中の10 μ lの10 \times 増幅用バッファー〔100mM トリス \cdot HCl、pH 8.3、500mM KCl、15mM MgCl₂、0.1%(w/v)ゼラチン〕、10 μ lの1.25mM dNTPの混合液(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、1 μ lの20 μ M pU-1Mプライマー、1 μ lの20 μ M pU-2Rプライマー、0.5 μ lの5ユニット/ μ lのタックポリメラーゼを加え、更に滅菌水を加えて100 μ lの溶液にした。この反応液は上層に100 μ lのミネラルオイル(シグマ社)を加えた後、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラー(宝酒造社)により増幅反応を行っ

た。反応条件は94℃、1分の変性→55℃、2分間のプライマーのアニリング→72℃、2分間の合成反応のサイクルを30サイクル行った。反応後上層のミネラルオイルを除去した後、反応液の10μlを取り、3%ヌシーブ(Nusieve)GTGアガロース-1%シーケム(SeaKem)アガロース(FMC社)ゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色し、増幅されたDNAを確認した。前記8種類のHPVプラスミドDNAを鋳型とした場合、pHPV16、pHPV18、pHPV31、pHPV33、pHPV52b、pHPV58からそれぞれ238bp、268bp、232bp、244bp、231bp、244bpのバンドが検出された。pHPV6、pHPV11からはバンドが検出されなかった。すなわちプライマー対pU-1M及びpU-2Rは、悪性腫瘍で広く見出されている悪性型HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV52b、HPV58 DNAを特異的に増幅していた。

【0031】(1-3) 制限酵素切断パターンによるタイピング

(1-2)で増幅したDNA断片を含む反応液90μlに、フェノールとクロロホルムの等量混合液90μlを加え、静かにかくはんし、12000rpm、5分間遠心後、水層を分離した。この水層に90μlのクロロホルムを加え、静かにかくはんし、同様に遠心して水層を分離した。この水層に9μlの3M酢酸ナトリウム、200μlのエタノールを加え、充分かくはんし、-70℃、15分間放置後、12000rpm、10分間遠心し、DNA断片を精製、回収した。沈殿は80%エタノールでリンスした後、乾燥させ、34μlの滅菌水に溶解した。このDNA溶液8.5μlに10×AvalI反応用バッファー(100mM トリス・HCl、pH8.0、70mM MgCl₂、600mM NaCl、70mM 2-メルカプトエタノール)1μl、制限酵素AvalI0.5μlを加え、全量を10μlの溶液にした。この液を37℃、2時間反応させた後、反応液全量を前記の3%ヌシーブGTGアガロース-1%シーケムアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、DNAの切断パターンを観察した。その結果、pHPV16由来の断片は、157bpと81bpに、pHPV18由来の断片は172bpと96bpに、pHPV33由来の断片は、136bpと108bpに切断され、3者の切断パターンははっきりと区別された。pHPV31、pHPV52b、pHPV58由来の断片は切断されなかった。次にこれら6種類をRsaIで反応させたところ、pHPV31由来の断片のみが118bpと114bpに切断された。同様にこれら6種類をBglIIで反応させたところ、pHPV52b由来の断片のみが176bpと55bpに切断された。最後にこれら6種類をAccIで反応させたところ、pHPV58由来の断片のみが126bpと118bpに切断された。したがってAvalI、RsaI、BglII、AccIの4種類の制限

酵素を組合せることにより、プライマー対pU-1M及びpU-2R由来の6種のDNA断片は、すべてタイピングできることが確認された。

【0032】(1-4) pU-31B及びpU-2Rを用いたHPV DNA特定領域のPCR法による増幅とタイピング

(1-2)に記したHPV DNA全長が挿入されたプラスミド8種類を鋳型に、プライマー対pU-31B及びpU-2Rを用いてPCRを行った。反応液の組成、温度サイクル、電気泳動法等は、(1-2)と全く同様に行った。その結果、pHPV6、pHPV11を鋳型にしたときに、両者とも230bpのバンドが検出された。pHPV16、pHPV18、pHPV31、pHPV33、pHPV52b、pHPV58からはいずれもバンドは検出されなかった。すなわちプライマー対pU-31B及びpU-2Rは、良性腫瘍で広く見出される良性型HPV6、HPV11 DNAを特異的に増幅していた。更にpHPV6、11由来の増幅DNA断片を制限酵素RsaIで反応させたところ、pHPV6由来の断片は134bpと96bpに、pHPV11由来の断片は166bpと64bpに切断され、両者の切断パターンは、はっきり区別された。これによりpU-31B及びpU-2R由来の2種類のDNA断片は、制限酵素RsaIでタイピングできることが確認された。

【0033】(1-5) 型共通オリゴヌクレオチドプライマーを用いたpU-1M及びpU-2R増幅断片の高感度検出

pU-1M及びpU-2R増幅断片がアガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色で確認できないとき、検出感度を上げるため、配列表の配列番号29~31に示した型共通オリゴヌクレオチドプローブを用いて、ドットハイブリダイゼーションを行った。まず型共通プローブが、pU-1M及びpU-2R増幅断片とのみ特異的にハイブリダイズすることを検討した。子宮筋腫患者より得た健常な子宮頸部組織片100mgを解剖はさみで充分細かく切った後、ポリスチレン製チューブに回収した。このチューブに100μg/mlになるようにプロテナーKを加えたTEバッファー5mlを加え、70℃、2時間処理した。この後(1-3)で示したようなフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行い、約100μgのゲノムDNAを回収し、1μg/1μlとなるようにTEバッファーに溶かした。この健常組織DNA液と、(1-2)、(1-4)で得たPCR反応液を94℃、10分間処理し、氷中で急冷してDNAを変性させた。これらDNA液1μl分をナイロンメンブラン(シュライヘルウントシュエル)上にスポットし、紫外線トランスイルミネーター(254nm)に10分照射し、DNAをメンブランに固定した。このメンブランは、プレハイブリダイゼーションバッファー(5×デンハーツ液、5×SSC、100μg/mlサケ精子D

NA) 10 ml 中で 50℃、4 時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に³²Pにて 5' 末端をラベルしたプローブ DNA pBU-1、pBU-2 を加え、50℃、2 時間ハイブリダイゼーションを行った。プローブの³²P ラベルはメガラベルキット (宝酒造社) を用いて次のように行った。10 pmol/μl のプローブ DNA 1 μl、1 μl の×10 リン酸化バッファー、10 μCi/μl の [γ-³²P] ATP (アマシャム) 5 μl、10 ユニットの T4-ポリヌクレオチドキナーゼ 1 μl を含む反応液に滅菌水 2 μl を加えて 10 μl にし、37℃、30 分間反応させた。反応後 65℃、10 分間処理し、この反応液の 2 μl (約 10⁸ cpm) をハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーション後メンブランを 6×SSC、0.5% SDS を含む洗浄液 1 で室温で数分洗浄し、続いて、2×SSC、0.1% SDS を含む洗浄液 2 で 50℃、10 分間で 2 回洗浄した。メンブランは乾燥させた後、X 線フィルム (富士フィルム) を入れたカセット内で -70℃、1 時間感光させ、オートラジオグラフをとった。この結果、pU-1M 及び pU-2R で増幅した pHPV16、pHPV18、pHPV31、pHPV33、pHPV52b、pHPV58 由来の DNA 断片は pBU-1、pBU-2 混合プローブとハイブリダイズし、ドットが現れた。その他 pU-31B 及び pU-2R で増幅した pHPV6、pHPV11 由来の DNA 断片や、健康子宮頸部組織 DNA からは、ハイブリダイゼーションは全く認められなかった。この結果は、混合プローブ pBU-1、pBU-2 により、悪性腫瘍で広く見出される HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV52b、HPV58 DNA が特異的に検出できることを示すものである。そこで、このプローブのドットハイブリダイゼーションによる検出限界を、pHPV16 を用いたモデル実験系をつくり、検定した。ヒトの全ゲノム DNA の鎖長を 3×10⁹ bp として、pHPV16 が 10 コピー/ゲノム DNA となるように、pHPV16 を健康な子宮頸部から上述で得たゲノム DNA にて希釈した。すなわち、406 pg の pHPV16 を 10 μg の健康なゲノム DNA で希釈した。これを健康なゲノム DNA で順次 10 倍希釈し、pHPV16 の 10~10⁻⁶ コピー/ゲノム DNA のモデルテンプレート DNA を段階的に調製した。各モデルテンプレート DNA 1 μg を用いて、(1-2) に示した方法で PCR により DNA 断片を増幅させた。更に上述に示した方法で、ドットハイブリダイゼーションを行った。この結果 10⁻⁶ コピー/ゲノム DNA までドットが検出された。pHPV18、pHPV31、pHPV33、pHPV52b、pHPV58 についても同様のモデル実験を行ったが、同じ結果を得た。すなわち、pBU-1、pBU-2 の混合プローブを用いれば、PCR 後のドットハイブリダイゼーションにより、細胞当たり 10⁻⁶ コピーの HPV DNA の検出が可能で

あることが確認された。

【0034】(1-6) 特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いたドットハイブリダイゼーションによるタイピング

pBU-1、pBU-2 混合プローブにより型に関係なく検出してきた試料をタイピングするため、配列表の配列番号 32~35 に示した型特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いた。上述の pHPV DNA 8 種類各 1 ng を鋳型として、(1-2) で示した方法でプライマー対 pU-1M 及び pU-2R により PCR を行った。この反応液及び (1-5) で調製した健康子宮頸部組織 DNA 各 1 μl をナイロンメンブランにスポットした。同じメンブランを 4 枚準備し、配列表の配列番号 32~35 に示すプローブ pSB-16、pSB-18、pSB-31、pSB-33 を、順に各メンブランと別々にハイブリダイズさせた。この結果、順に pHPV16、pHPV18、pHPV31、pHPV33 由来増幅断片をスポットした箇所のみ強いドットが現れ、他の箇所には全くハイブリダイゼーションは認められなかった。これらより、配列表の配列番号 32~35 の型特異的オリゴヌクレオチドプローブ群は、配列表の配列番号 29~31 のユニバーサルプローブでの検出後のタイピングに有効であることが確認された。

【0035】(1-7) 二重 PCR 法による増幅

1 対のプライマーを用いて通常の方法で PCR を行った (1 次 PCR) 後、更に内側のプライマー対により再び PCR を行い (2 次 PCR)、感度よく目的 DNA を検出する方法、すなわち二重 PCR 法が知られている。二重 PCR 法による HPV の検出を行うために、(1-2) で示したプラスミド pHPV6、pHPV11、pHPV16、pHPV18、pHPV31、pHPV33、pHPV52b、pHPV58 それぞれ 1 ng をプライマー p16-1 及び pU-2R を 1 次 PCR 用プライマーとして用いて (1-2) に示した方法で 30 サイクル PCR を行った。次に、1 次 PCR の反応液 0.5 μl を新しい 0.5 ml 用チューブ (パイオビック社) により、(1-2) と同様にプライマー pU-1M、pU-2R を用いて、15 サイクル 2 次 PCR を行った。その結果、pHPV16、18、31、33、52b 及び 58 からそれぞれ増幅 DNA が認められた。更に、それぞれのウイルス型は (1-3) と同様に制限酵素、AvaI、RsaI、BglII 及び AccI の切断パターンにより同定できた。また、2 次 PCR において、プライマーとして pU-31B 及び pU-2R を用い、(1-4) と同様に 15 サイクル 2 次 PCR を行った結果、pHPV6 及び pHPV11 のみに増幅が認められ、更に、RsaI の切断パターンにより HPV6 と HPV11 が識別できた。また、p16-1 のかわりに pU-O を用いた場合、その検出感度は 10 倍に上昇した。

【0036】実施例 2 子宮頸がん組織における HPV

DMAの検出

39例の子宮頸がん摘出組織約100mgより(1-5)の方法により、ゲノムDNAを約100 μ g得た。これらのゲノムDNA1gを94℃、10分間熱変性させた後、ジーン アンプ キット中の10 μ lの $\times 10$ バッファー、16 μ lの1.25mM dNTP混合液、0.5 μ lの5ユニット/ μ lタックポリメラーゼ、及びセンスプライマーpU-1M 1 μ l、アンチセンスプライマーpU-2R 1 μ lを加え、滅菌水を加えて100*

表 4

HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV 52b
19/39	5/39	2/39	2/39	1/39
(48.7%)	(12.8%)	(5.1%)	(5.1%)	(2.6%)
HPV58	未同定HPV		全 体	
3/39	4/39		33/39	
(7.7%)	(10.3%)		(84.6%)	

【0039】なお表中3試料が複合感染(HPV16+HPV18、HPV18+HPV33、HPV18+HPV58)であり、4試料中からHPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV52b、HPV58以外の悪性型HPVが検出された。

※【0040】また表5に示すように、前がん病変組織25例中より、全体で13例(52.0%)HPVDNAを検出することができた。

【0041】

【表5】

表 5

HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV 52b
9/25	0/25	3/25	0/25	0/25
HPV58	未同定HPV		全 体	
2/25	1/25		13/25	
			(52.0%)	

【0042】なお表中2試料が複合感染(HPV16+HPV58、HPV16+HPV

【0043】実施例3 未同定HPVのクローニングとシーケンシング

(3-1) 未同定HPVのクローニング

ライブラリー作製用のベクターには、シャロミド(Chromid)9-36(ニッポンジーン社)を用い、ライブラリー作製法は斎藤らの方法[斎藤I. (Saito, I.) 及びスタークE. R. (Stark, E. R.), プロシーディングス オブザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ USA, 第83巻, 第8664頁(1986)]に従った。まず、実施例2に示した未同定HPVDNAを含むヒトゲノムDNA10 μ gをHindIIIで完全分解した。この試料を0.8%アガロースゲル中で電気泳動し、8kb付近を切り出し、透析チューブで用いてDNAを精製した。精製したDNAを10 μ lのTEバッファーに溶かし、その一部を用いて260nm紫外吸収を基にDNA濃度を測定したところ、約300ng/ μ lの濃度であった。次に、シャロミド9-36

ベクター2 μ gをHindIII数ユニットで完全に分解した。反応液全量は50 μ lとした。反応終了後0.5M

EDTA1.5 μ lを加え酵素の働きを止め、更に70℃10分熱処理して酵素を失活させた。このベクター液26 μ l(1 μ g)に先程のヒトゲノムからの回収DNA1 μ l(300ng)を加え、次にエタノール沈殿を行った。沈殿は80%エタノールでリンスした後、直ちに4、5 μ lのTEバッファーに溶かした。更に10 \times T4DNAリガーゼバッファー0.7 μ l、1mM ATP0.7 μ l、T4DNAリガーゼ0.7 μ lを加え、16℃で一晩反応させた。翌日インビトロパッケージングを、GIGAPACK II パッケージングエキストラクト(ストラトジーン社)を用いて次の手順で行った。まず反応液1 μ lをキット中の凍結融解液(Freeze/thaw extract)に加え、直ちにソニック・エキストラクト液(Sonic extract)15 μ lを加えた。そしてチップの先で良くかくはんした後、室温で2時間放置した。その後SMバッファーを500 μ lとクロロホルム2 μ lを加え、ゲノムライブラリー液とした。一方、前日より大腸菌株D

H5を0.7%マルトースを含むLプロス液体培地中で一晩振とう培養し、培養液1mlより遠心分離により菌体を回収し、10mM MgSO₄液0.5mlに懸濁した。この指示菌液100μlに、先程のライブラリー液100μlを加え、25℃15分放置することによりファージを大腸菌に感染させた。感染後Lプロス培地1mlを加え37℃で30分放置した。この液の1/200量(6μl)、1/20量(60μl)、1/2量(600μl)をアンピシリン50μg/mlを含むLプロスプレートにそれぞれ播種し、37℃一晩培養した。その結果、6μl播種したプレートに約700個のコロニーが現れ、ベクター1μg当たり約4.9×10⁶個のコロニー形成能をもつライブラリーが作製できた。そこでこのライブラリーより目的のクローンを見つけるために、標識プローブを用いたスクリーニングを行った。まずプレートあたり約700個のコロニーが現れるよう、10枚のプレートにライブラリーのファージを播種した。このプレートの上にナイロンメンブランをおき、約1分静置後メンブランをはがしてコロニーをメンブランに張り付けた。トランスファーの終わったプレートは3時間ほど37℃でインキュベートし、再びコロニーを大きくしてから同様の操作を繰返した。すなわち、1枚のプレートより2枚のレプリカが作製された。これらのメンブランを、200mlの変性液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)で7分間変性し、200mlの中和液(0.5M トリス・HCl、pH7.5、1.5M NaCl)で5分間中和後、紫外線を5分間照射しDNAを固定した。これらのメンブランをプレハイブリダイゼーションバッファー(5×デンハーツ液、6×SSC、0.5% SDS、100μg/mlサケ精子DNA)10ml中で65℃で6時間処理し、プレハイブリダイゼーションを行った。他方、実施例2で得られたPCRで増幅したHPVDNAフラグメントを10μlのTEバッファーに溶かして4%アガロースゲル中で電気泳動した。泳動終了後ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、HPVDNAフラグメントのバンド付近を切り出した。このゲル断片を少量の泳動バッファーと共に透析チューブに入れ、ゲル内のDNAがチューブ内液に出てくるまで電気泳動を行った。その後このチューブ内液を回収し、フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿とリンス及び乾燥を行いDNAを精製した。これを3μlのTEバッファーに溶かし、標識DNAプローブ作製の鋳型とした。DNAプローブの標識法はファインバーらの方法〔ファインバー A. P. (Feinber, A. P.) 及びフォーゲルシュタイン B. (Vogelstein, B.), アナリチカル バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 第132巻、第6頁(1983)]に従い、ランダムプライマーDNAラベリングキット(宝酒造社)を用いて行った。上記の精製HPVDNAフラグメント3μlにキット中のランダムプライマー液2μlを加え、94℃で

3分熱処理後水中で急冷した。次いで10×バッファー2.5μl、dNTP混合液2.5μl、水9μl、[α-³²P] dCTP (3000Ci/mM; アマシャム社) 5μl、クレノウ酵素1μlを順次加え全量を25μlとした。酵素反応を37℃で3時間行った後再び94℃3分熱処理し、標識DNAプローブとして用いた。ハイブリダイゼーションは、プレハイブリダイゼーションと同じ液3mlに標識プローブを加え、65℃で12時間行った。ハイブリダイゼーション後メンブランを2×SSC、0.5% SDSを含む洗浄液1で室温で5分、続いて2×SSC、0.1% SDSを含む洗浄液2で室温で15分、更に0.1×SSC、0.5% SDSを含む洗浄液3で37℃で30分、最後に洗浄液3で65℃で30分洗浄した。メンブランは乾燥させた後、X線フィルム(コダック社)を入れたカセット内で-80℃で7時間感光させオートラジオグラフをとった。こうして約7000個のコロニーをスクリーニングした結果、1つのポジティブシグナルが見つかり、シグナル付近の各々独立したコロニー約50個をマスタープレートに植え継ぎ、2次スクリーニングをして最終的に目的のクローンを単離した。

【0044】(3-2) クローン化したHPVDNAのpUC119 HindIIIサイトへのサブクローニングと、制限酵素切断地図の作製

(3-1)で最終的に単離したコロニーは、50μg/mlアンピシリン入りプロス液体培地5ml中で37℃一晩振とう培養し、以下の手順によりアルカリ法を用いてプラスミドを調製した。まず培養液1.5mlを15000回転で1分間遠心し、菌体を回収した。この菌体に100μlのグルコース-リゾチーム液(50mM グルコース、10mM EDTA、25mM トリス・HCl pH8.0、4mg/ml リゾチーム)、200μlのアルカリ液(0.2N NaOH、1% SDS)、150μlの5M 酢酸カリウム溶液(pH4.8)を順次加えた後、15000回転で10分間遠心して上清を回収した。上清をフェノール/クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿と80%エタノールリンス及び乾燥をしてプラスミドDNAを精製した。これを50μg/ml RNase Aを含むTE20μlに溶かし、そのうち5μlをHindIIIで切断した。切断後反応液を0.8%アガロース中で電気泳動したところ、約8kbの挿入断片が確認できたので、これを切り出し、透析チューブを用いてDNAを精製した。一方マルチクローニングサイトにあるHindIIIサイトで同酵素で切断したプラスミドDNA pUC119を用意し、ライゲーションキット(宝酒造社)を用いて精製DNAとライゲーションさせた。この組換えプラスミドでJM109コンピテントセルをトランスフォーメーションし、50μg/mlのアンピシリンを含むLプロスプレート上でコロニーを形成させた後、幾つかのコロニーから再びアルカリ法によりプラスミドを精

製、回収した。こうして構築したプラスミドは、8 kbのHPVDNA挿入断片が各々逆向きにサブクローニングされた2種類があることが予想された。実際、HindIIIで切断したときは8 kbの挿入断片が切り出されるが、BamHIで切断したとき、一方は約1.4 kbの断片が、もう一方は約6.6 kbの断片が切り出されてくる場合があった。そこでBamHIで約1.4 kbが切り出されてくるプラスミドをpHPV-Sapporo、6.6 kbが切り出されてくるプラスミドをpHPV-Sapporo-Rと命名した。制限酵素切断地図の作製については、例えばPstIの切断位置は次のように決めた。pHPV-SapporoをPstIで切断すると1.2 kb、4.7 kb、5.2 kbの3本のDNAフラグメントに分かれる。pUC119自身はPstI切断点をマルチクローニングサイトに一か所持つので、HPVDNA自身は2か所のPstIサイトを持つことが予想される。また3本のフラグメントのうち一つが、pUC119 DNAほぼすべてとHPVDNAの一部をつながつたものであることが予想される。一方、pHPV-Sapporo-RをPstIで切断すると2.1 kb、4.3 kb、4.7 kbの3本のDNAフラグメントに分かれる。このようにどちらのプラスミドからも4.7 kbフラグメントが切り出されているので、これはHPVDNA内部から切り出され、プラスミドDNAを含まないことが分かる。こうした予想から、この2種のプラスミド内のPstIの切断位置は一通りのみが考えられる。このようにして幾つかの制限酵素について切断地図を作製した(図1)。またこのHPVDNAはHpaI、SalI、SmaI、XhoIの認識部位を持たないこともわかった。この切断地図と、従来既にクローニングされて論文に発表されている60種近いHPVDNAの切断地図を比較した結果、このHPVは既に発表されているどのHPVにも当てはまらないことが判明した。したがってこのHPVは、新しい遺伝子型である。また、実施例2の表4に示した未同定のHPV4種はすべて同じ制限酵素地図を有し、同じタイプであった。

【0045】(3-3) クローン化したHPVDNA

E6及びE7領域の塩基配列の決定

図1に示した制限酵素地図において、1.2 kbのPstI断片にE6及びE7領域が含まれると予想された。そこで(3-2)で得られたプラスミドpHPV-SapporoをPstI及びHindIIIで切断し、得られた1.2 kbの断片を(3-2)に示した方法と同様にM13mp19 RF DNAのPstI及びHindIII部位にサブクローニングした。このプラスミドから、ヘニコフの方法(ヘニコフ

S. (Henikoff, S.), ジーン(Gene)、第28巻、第351頁(1984))に従い、キロシーケンシング用デレーションキット(宝酒造社)を用いて、挿入断片の3'末端から様々の長さのDNAが欠失した変異体を作製した。まずこのプラスミドを(3-2)と同様にアルカリ法で精製した後、その10 µgをKpnIとXbaIで

同時に切断した。これをフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿、80%エタノールリンスと乾燥をして精製した。これをキット中のExoIIIバッファー100 µlに溶かし、ExoIIIヌクレアーゼ1 µlを加え25℃で反応した。反応開始後、30秒ごとにあらかじめ用意したキット中のマングビーンバッファー100 µlに10 µlずつ移し、5分後に全量に移し終えて反応液全量は200 µlとなった。これを65℃5分熱処理してExoIIIヌクレアーゼを失活させたあと、マングビーンヌクレアーゼ2 µlを加え、37℃60分反応させDNAの末端を平滑化した。この液のDNAをもう一度精製後、キット中のクレノウバッファー50 µlに溶かし、クレノウ酵素1 µlを加え37℃15分反応し、再度DNAを精製した。このDNAを20 µlのTEバッファーに溶かし、ライゲーションキットA液100 µlとB液20 µlを添加し、16℃で一晩反応を行った。このDNAを再び精製後、XbaI数ユニットで37℃1時間反応させた。反応液全量30 µlはJM109コンピテントセル200 µlにトランスフォーメーションし、プレート上でブランクを形成させた。現れたブランクのうち任意の32個を指示菌の入った2×YT培地に植え継ぎ、37℃で5時間振とう培養した。培養液の上清と菌体を分離し、菌体からアルカリ法でプラスミドを精製した。これをEcoRI-PstIで切断し反応液の一部をアガロース電気泳動することにより、挿入断片の長さを確認した。この結果、本来の挿入断片約1.2 kbの3'末端から約100 bp~1000 bpが欠失した、いろいろな長さの挿入断片を持つプラスミドが得られた。そこでこのうち適当なクローンを幾つか選んで、それら培養液上清より一本鎖DNAを精製し、M13シーケンシングキット(宝酒造社)を用いて塩基配列の解読を行った。こうして、配列表の配列番号36に示される図1の1.2 kbのPstI切断フラグメント中の、約1 kbの塩基配列が決定できた。この配列をDNASIS(宝酒造社)で解析した結果、HPV16 DNAあるいはHPV31 DNAのE6とE7領域の配列と非常にホモロジーが高いことがわかり、確かにE6とE7領域をシーケンシングしたことが確かめられた。また、従来報告されているHPVのE6及びE7領域とは完全に一致するものではなく、この未同定HPVは新しい遺伝子型であった。この新しい遺伝子型を有するHPVをHPV-sapporoと命名した。この配列をアミノ酸に翻訳したところ、可能性のある3通りのオープンリーディングフレームに対して、開始コドン(ATG)や停止コドン(TAA、TAG、TGA)、あるいはHPV16のE6やE7タンパクのアミノ酸配列との相関より、配列表の配列番号36に示すアミノ酸配列を決定した。この中には、DNA結合タンパクと相関を持つCys-Cysモチーフやレチノブラストーマタンパク結合モチーフが、従来のHPV16やHPV31のものと同様保存されてい

た。

【0046】実施例4 HPV-Sapporo のPCR法による検出

(4-1) 共通プライマーを用いた2重PCRによる増幅と制限酵素切断パターンによるタイピング

(3-2) でクローニングしたプラスミドpHPV-Sapporo 1ngを(1-7)と同様にプライマーp16-1とpU-2RあるいはpU-OとpU-2Rを用いて30サイクルの1次PCRを行った。次に1次PCRの反応液0.5μlをプライマーpU-1MとpU-2Rを用いて15サイクルの2次PCRを行い、232bpの増幅断片を得た。この増幅断片を制限酵素AvaIにより切断した結果、186bpと46bpの切断パターンが得られた。AvaIによる切断は、pHPV16、18、31、33、52b、及び58の増幅断片には認められなかった。したがって、AvaIによる切断によりHPV-Sapporoを同定することができた。

【0047】(4-2) 型特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いたドットハイブリダイゼーションによるタイピング

プライマーpU-1MとpU-2Rによる増幅領域内に、配列表の配列番号37に示すHPV-Sapporoに特異的なプローブpSB-Sを実施例(1-1)と同様の方法で作製した。(4-1)で得た2次PCRの増幅断片を(1-6)と同様の方法で、該pSB-Sを用いてドットハイブリダイゼーションを行った。その結果、pHPV-Sapporoのみにドットが現われ、pHPV16、18、31、33、52b、58からの増幅断片にはドットが現れなかった。したがって、pSB-Sプローブを用いたドットハイブリダイゼーションにより、HPV-Sapporoを特異的に検出することができた。

【0048】(4-3) HPV101の特異的増幅と検出

(3-3)で明らかにしたHPV-SapporoのE6及びE7領域の塩基配列からHPV-Sapporoに特異的な領域を用いてオリゴヌクレオチドプローブ及びプライマーを設定すれば、HPV-SapporoをPCR法を用いて特異的に増幅し、特異的なプローブにより高感度に検出することができる。例えば、配列表の配列番号38及び配列番号39に示したプライマー対pS-1及びpS-2

Rを実施例(1-1)と同様に合成し、次にこれらを用いて(1-2)と同様に増幅を行い、HPV-Sapporoの142bpの領域を増幅することができた。また、配列表の配列番号40に示すプローブpBS-1を同様に合成し、これを用いて(1-6)と同様にドットハイブリダイゼーションを行い、HPV-Sapporoを特異的に検出することができた。pHPV16、18、31、33、52b、58ではプライマー対pS-1及びpS-2Rを用いても増幅は認められず、プローブpBS-1を用いたドットハイブリダイゼーションでもドットは認められなかった。

【0049】実施例5 HPV増幅・検出用キットの作成

試料中のHPVを増幅、検出するためのキットを作成した(表6及び表7)。1次PCR増幅用プライマーとしてpU-O及びpU-2Rが各20μM溶液となるようにTEバッファーに溶解し、1次PCRプライマー液(A剤)とした。同様に、プライマーpU-1M及びpU-2Rを含む2次PCR悪性型HPVプライマー液(B剤)、プライマーpU-31B及びpU-2Rを含む2次PCR良性型HPVプライマー液(C剤)を作成した。DNA検出用プローブとして、pBU-1及びpBU-2が各10μM溶液となるようにTEバッファーに溶解し、悪性型HPV検出用プローブ液(D剤)とした。同様に、プローブpBU-3を含む良性型HPV検出用プローブ液(E剤)、pSB-16を含む悪性型HPV16型特異的プローブ液(F剤)、pSB-18を含む悪性型HPV18型特異的プローブ液(G剤)、pSB-31を含む悪性型HPV31型特異的プローブ液(H剤)、pSB-33を含む悪性型HPV33型特異的プローブ液(I剤)、pSB-Sを含む悪性型HPV-Sapporo型特異的プローブ液(J剤)を作成した。また、増幅断片を制限酵素の切断パターンによりHPVのタイピングを行うために、タイピング用制限酵素AvaII液(K剤)、RsaI液(L剤)、BglII液(M剤)、AccI液(N剤)、AvaI液(O剤)を作成した。本キットを用いて、実施例1、2及び4と同様にHPVを増幅・検出することができた。

【0050】

【表6】

表6 HPV増幅・検出キット

A剤	1次PCRプライマー液	20μl
	20μM pU-O	(1μl×20回)
	20μM pU-2R	
B剤	2次PCR悪性型HPVプライマー液	
	20μM pU-1M	20μl
	20μM pU-2R	(1μl×20回)
C剤	2次PCR良性型HPVプライマー液	
	20μM pU-31B	20μl

23

24

	20 μ M pU-2R	(1 μ l \times 20回)
D剤	悪性型HPV検出用プローブ液	
	10 μ M pBU-1	20 μ l
	10 μ M pBU-2	(1 μ l \times 20回)
E剤	良性型HPV検出用プローブ液	
	10 μ M pBU-3	20 μ l
		(1 μ l \times 20回)
F剤	悪性型HPV16型特異的プローブ液	
	10 μ M pSB-16	20 μ l
		(1 μ l \times 20回)

【0051】

* * 【表7】

表 7 HPV増幅・検出キット

G剤	悪性型HPV18型特異的プローブ液	
	10 μ M pSB-18	20 μ l
		(1 μ l \times 20回)
H剤	悪性型HPV31型特異的プローブ液	
	10 μ M pSB-31	20 μ l
		(1 μ l \times 20回)
I剤	悪性型HPV33型特異的プローブ液	
	10 μ M pSB-33	20 μ l
		(1 μ l \times 20回)
J剤	悪性型HPV-Sapporo 型特異的プローブ液	
	10 μ M pSB-S	20 μ l
		(1 μ l \times 20回)
K剤	タイピング用制限酵素AvaII液	
	10ユニット/ μ l	10 μ l (0.5 μ l \times 20回)
L剤	タイピング用制限酵素RsaI液	
	10ユニット/ μ l	10 μ l (0.5 μ l \times 20回)
M剤	タイピング用制限酵素BglII液	
	10ユニット/ μ l	10 μ l (0.5 μ l \times 20回)
N剤	タイピング用制限酵素AccI液	
	10ユニット/ μ l	10 μ l (0.5 μ l \times 20回)
O剤	タイピング用制限酵素AvaI液	
	10ユニット/ μ l	10 μ l (0.5 μ l \times 20回)

【0052】

【発明の効果】以上詳細に説明した様に、本発明により、良性型及び／又は悪性型HPVに共通な遺伝子領域が見出され、この領域の遺伝子配列を検出することにより、試料中の良性型及び／又は悪性型HPVの簡便かつ高感度な検出方法が提供された。また、各HPV型に特異的なプローブを用いるハイブリダイゼーションや制限酵素処理によって、各HPVのタイピングを簡便に行うことが可能となった。

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：ATAGGAGGACCGAAAAACGGT 21

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：TGCTAATTCGGTGCTACCTG 20

配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

50 配列：CCTACACTGCTGGACAACAT 20

25

配列番号: 4
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: GAGCAATTAGTAGACAGCTC 20
 配列番号: 5
 配列の長さ: 21
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: AGAGGAGGGACCGAAAACGGT 21
 配列番号: 6
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: TGTTAATTCGTTGTACCTG 20
 配列番号: 7
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: CTTACACTGCTGGACAACAT 20
 配列番号: 8
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: GAGCAATTAGAAGACAGCTC 20
 配列番号: 9
 配列の長さ: 21
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: AAGGGCGTAACCGAAATCGGT 21
 配列番号: 10
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: TGTCAAAGCCACTGTGTCC 20
 配列番号: 11

26

配列の長さ: 29
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: TTAGATTTGCAACCAGAGACAACTGATCT 29
 配列番号: 12
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: GAGCAATTAAATGACAGCTC 20
 配列番号: 13
 配列の長さ: 21
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: AAGGGAGTAACCGAAAACGGT 21
 配列番号: 14
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: TGCCAGAAACCGTTGAATCC 20
 配列番号: 15
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: GAGCAATTAAGCGACTCAGA 20
 配列番号: 16
 配列の長さ: 21
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: TAGGGAGTGACCGAAAGTGGT 21
 配列番号: 17
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: TGTCAAAGACCGTTGTGTCC 20
 配列番号: 18
 配列の長さ: 29

27

配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：TTAGATTGCAACCTGAGGCAACTGACCT 29
 配列番号：19
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：GAGCAATTACCCGACAGCTC 20
 配列番号：20
 配列の長さ：21
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：TAGGGTGTAAACCGAAAGCGGT 21
 配列番号：21
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：TGTCAAAGACCTTTGTGTCC 20
 配列番号：22
 配列の長さ：29
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：TTAGATTATATCCTGAACCAACTGACCT 29
 配列番号：23
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：GAGCAATTAAGTGACAGCTC 20
 配列番号：24
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：AGGGAGTGACCGAAAACGGT 20
 配列番号：25
 配列の長さ：21
 配列の型：核酸

28

鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：AAGGGCGTAACCGAAATCGGT 21
 配列番号：26
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 10 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：TGCTAATTCGGTGCTACCTG 20
 配列番号：27
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：TGTCAAAACCGTTGTGTCC 20
 配列番号：28
 20 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：GAGCTGTGCTTAATTGCTC 20
 配列番号：29
 配列の長さ：29
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 30 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列の特徴：19番目のNはI（イノシン）
 配列：TTAGATTTRCAWCCTGARNCAACTGACCT 29
 配列番号：30
 配列の長さ：29
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 40 配列：GAGCCCCAAAATGAAATTCGGTTGACCT 29
 配列番号：31
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：CCTACACTGCTGGACAACAT 20
 配列番号：32
 配列の長さ：20
 50 配列の型：核酸

29

鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: CAGATCATCAAGAACACGTA 20
 配列番号: 33
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: AACCGAGCAGCAGGAACG 20
 配列番号: 34
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: GAGAAGACCTCGTACTGAAA 20
 配列番号: 35
 配列の長さ: 20

30

配列の型: 核酸
 鎖の数: 1本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)
 配列: CTGCACTGTGACGTGTAAAA 20
 配列番号: 36
 配列の長さ: 1023
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 2本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: Genomic DNA
 配列の特徴:
 250-696 E CDS (E 6領域)
 702-998 E CDS (E 7領域)
 337-348 S Cys-Cys モチーフ
 436-447 S Cys-Cys モチーフ
 876-887 S Cys-Cys モチーフ
 975-986 S Cys-Cys モチーフ
 762-815 S レチノプラストーマ蛋白結合モチーフ

20

配列:

TCCTGCCAAC TTAAAGTTGA AACATGCATG TAAAACATTA CTCACTGTAT TACACATTGT	60
TATATGCACA CAGGTGTGTC CAACCGATTT GGATTACAGT TITATAAGCA TTICTTTTIA	120
TTATAGTTAG TAACAATTAT CCTATAAAA AAAACAGGGA GTGACCGAAA ACGGTCGTAC	180
CGAAAACGGT TGCCATAAAA GCAGAAGTGC ACAAAAAAGC AGAAGTGGAC AGACATTGTA	240
AGGTGCGGT	249
ATG TTT CAG GAC CCA GCC GAA AGA CCC TAC AAA CTG CAT GAT TTG	294
Met Phe Gln Asp Pro Ala Glu Arg Pro Tyr Lys Leu His Asp Leu	
1 5 10 15	
TGC AAC GAG GTA GAA GAA AGC ATC CAT GAA ATT TGT TTG AAT TGT	339
Cys Asn Glu Val Glu Glu Ser Ile His Glu Ile Cys Leu Asn Cys	
20 25 30	
GTA TAC TGC AAA CAA GAA TTA CAG CGG AGT GAG GTA TAT GAC TTT	384
Val Tyr Cys Lys Gln Glu Leu Gln Arg Ser Glu Val Tyr Asp Phe	
35 40 45	
GCA TGC TAT GAT TTG TGT ATA GTA TAT AGA GAA GGC CAG CCA TAT	429
Ala Cys Tyr Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Glu Gly Gln Pro Tyr	
50 55 60	
GGA GTT TGC ATG AAA TGT TTA AAA TTT TAT TCA AAA ATA AGT GAA	474
Gly Val Cys Met Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu	
65 70 75	
TAT AGA CGG TAT AGA TAT AGT GTG TAT GGA GAA ACG TTA GAA AAA	519
Tyr Arg Arg Tyr Arg Tyr Ser Val Tyr Gly Glu Thr Leu Glu Lys	
80 85 90	
CAA TGC AAC AAA CAG TTA TGT CAT TTA TTA ATT AGG TGT ATT ACA	564
Gln Cys Asn Lys Gln Leu Cys His Leu Leu Ile Arg Cys Ile Thr	
95 100 105	
TGT CAA AAA CCG CTC TGT CCA GTT GAA AAG CAA AGA CAT TTA GAA	609
Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Val Glu Lys Gln Arg His Leu Glu	
110 115 120	

31		32
GAA AAA AAA CGA TTC CAT AAC ATC GGT GGA CGG TGG ACA GGT CGG		654
Glu Lys Lys Arg Phe His Asn Ile Gly Gly Arg Trp Thr Gly Arg		
125	130	135
TGT ATG TCC TGT TGG AAA CCA ACA CGT AGA GAA ACC GAG GTG TAATC		701
Cys Met Ser Cys Trp Lys Pro Thr Arg Arg Glu Thr Glu Val		
140	145	
ATG CAT GGA GAA ATA ACT ACA TTG CAA GAC TAT GTT TTA GAT TTG		746
Met His Gly Glu Ile Thr Thr Leu Gln Asp Tyr Val Leu Asp Leu		
1	5	10
GAA CCC GAG GCA ACT GAC CTA TAC TGT TAT GAG CAA TTG TGT GAC		791
Glu Pro Glu Ala Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Cys Asp		
20	25	30
AGC TCA GAG GAG GAG GAA GAT ACT ATT GAC GGT CCA GCT GGA CAA		836
Ser Ser Glu Glu Glu Glu Asp Thr Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln		
35	40	45
GCA AAA CCA GAC ACC TCC AAT TAT AAT ATT GTA ACG TCC TGT TGT		881
Ala Lys Pro Asp Thr Ser Asn Tyr Asn Ile Val Thr Ser Cys Cys		
50	55	60
AAA TGT GAG GCG ACA CTA CGT CTG TGT GTA CAG AGC ACA CAC ATT		926
Lys Cys Glu Ala Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Ile		
65	70	75
GAC ATA CGT AAA TTG GAA GAT TTA TTA ATG GGC ACA TTT GGA ATA		971
Asp Ile Arg Lys Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Phe Gly Ile		
80	85	90
GTG TGC CCC GGC TGT TCA CAG AGA GCA TAATCTACAA TGGCTGATCC TGCAG		1023
Val Cys Pro Gly Cys Ser Gln Arg Ala		
95		

配列番号: 37

配列の長さ: 19

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列: GTTGAAACCAACACGTAG 19

配列番号: 38

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列: AACGGTCGTACCGAAAACGGT 21

配列番号: 39

配列の長さ: 19

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

30 トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列: TCITCTACCTCGTTGCACA 19

配列番号: 40

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

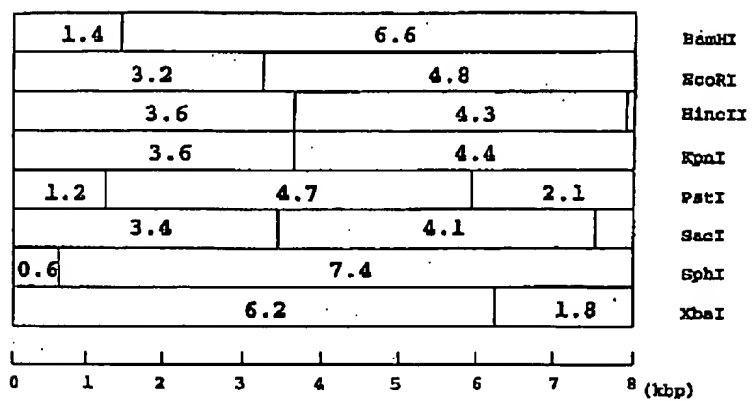
配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列: AAGTGGACAGACATTGTAAGGTGCGGT 27

40 【図面の簡単な説明】

【図1】クローニングした未同定HPVの制限酵素切断地図を示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 福島 道夫
 北海道札幌市中央区円山西町1-1-1-
 510

(72)発明者 藤永 ▲ケイ▲
 北海道札幌市中央区旭ヶ丘5丁目6-25